

重金属对大麦 (*Hordeum vulgare*) 毒性的研究*

张义贤

(山西大学生命科学系, 太原 030006)

摘要 研究了 6 种重金属(Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+})对大麦幼苗生长及根尖细胞遗传学毒害作用。结果表明,随着重金属浓度的增加和处理时间的延长,大麦种子的萌发率、根生长速率和有丝分裂指数下降。 $1 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 的 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 处理 24 h 后完全抑制了细胞分裂, Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 诱发的染色体畸变率显著高于 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 。用 5×10^{-3} — $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 处理 24 h 和 Ni^{2+} 处理 48 h 后,核仁结构发生分解,形成许多核仁颗粒并进入细胞质中,而 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对核仁结构没有影响。6 种重金属对大麦的细胞遗传学毒性顺序为 $\text{Hg}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ 。文中还讨论了重金属对植物细胞的毒害机理。

关键词 重金属; 大麦; 有丝分裂指数; 染色体畸变; 核仁; 银染技术

重金属广泛地存在于自然界中。近年来,国内外有关植物对重金属的吸收、积累和生理生化特性已有不少报道^[1-5],但多数研究只限于某单一重金属对植物的影响,而多种重金属对同一作物的毒性(特别是细胞学毒害效应)比较研究则很少报道。本实验以大麦为材料,研究了不同浓度的重金属离子 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对大麦的种子萌发、根生长、细胞分裂、染色体及核仁的影响。旨在为农业生产早期预报重金属对作物的毒害效应,为环境监测中评价重金属污染提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试材料大麦(*Hordeum vulgare*, $2n=14$)种子由山西农科院品种资源所提供。

1.2 实验方法

实验所用 6 种重金属试剂为 HgCl_2 、 PbCl_2 、 CdCl_2 、 NiCl_2 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 ZnCl_2 。用去离子水配成浓度为 1×10^{-2} 、 5×10^{-3} 、 1×10^{-3} 、 5×10^{-4} 、 1×10^{-4} 、 $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的重金属盐溶液,浓度以纯金属离子计。选择健壮、饱满的大麦种子,经 0.03% NaClO 消毒后,一部分用于萌发试验,另一部分置于 26℃ 温箱内避光发芽。当胚根长至 1—2 mm 时,分别放入浓度已定的大培养皿(直径 250 mm)中处理 24—72 h,对照为蒸馏水,处理部位为根尖分生组

作者简介:男,40岁,副教授

* 山西省自然科学基金资助项目

织区 每 12 h 更换一次处理液 每 24 h 逐一测量根长, 并从每一处理组切取 10 个根尖用于细胞学毒性研究 根尖用 Carnoy's 液固定 24 h, 1 mol/L HCl 60 解离 6—8 min, 卡宝品红染色、压片、镜检 每一处理组观察 4000 个以上分裂细胞, 统计有丝分裂指数和染色体畸变率

研究重金属对核仁的影响采用改良的植物染色体 Ag-NOR 技术^[6] 固定后的根尖用 1 mol/L HCl 95% 乙醇 冰乙醇(5 3 2)60 处理 2—3 min, 45% 乙酸压片, 1% 明胶+50% AgNO₃ 溶液染色, 60 水浴温育 5—10 min, 当细胞质和染色体呈淡黄色, 核仁呈黑色或深棕色, 即示染色完成

2 实验结果

2.1 重金属对种子萌发和根生长的影响

不同浓度重金属处理后严重影响了种子的萌发率 由图 1 可见, 低浓度(1×10^{-4} — 5×10^{-5} mol/L)的重金属对种子萌发率影响较小, 萌发率均在 85% 以上 随着浓度的增加, 种子萌发率逐渐降低 当浓度增至 1×10^{-2} mol/L 时, Hg²⁺ 处理组的萌发率最低, 只有 9.6%. Pb²⁺、Cd²⁺ 处理组均在 45% 以下, 而 Zn²⁺ 处理组的萌发率最高, 达到 82%. 本实验还发现, 在 1 mol/L 浓度下, 6 种重金属处理的种子都不萌发

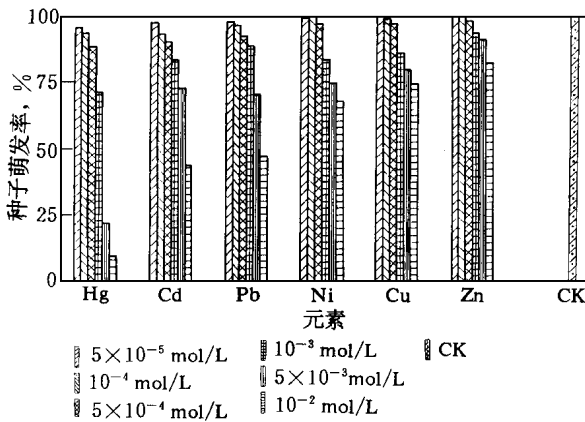


图 1 不同浓度重金属处理后大麦种子的萌发率

Fig. 1 Percentage germination of seeds of *Hordeum vulgare* at different concentrations of heavy metals

重金属处理后对幼苗根的生长也产生不同程度的抑制作用 随着处理时间的延长, 根的生长速率递减 但不同重金属离子的作用有差异 在高浓度(1×10^{-2} — 5×10^{-3} mol/L)处理组中, Hg²⁺、Cd²⁺、Pb²⁺ 表现出强烈的抑制作用, 处理 24 h 后根即停止了生长, 而其余浓度重金属的抑制作用较弱 从表 1 可以看出, 重金属处理 72 h 后, 对照与处理之间存在显著差异, 即便是低浓度处理组也是如此 例如, 在 5×10^{-5} mol/L 浓度下, Hg²⁺、Cd²⁺ 处理组的根长分别为 2.81 和 3.64 cm, 与对照相比, 降低 67.7% 和 53.8% ($P < 0.01$). Pb²⁺ 处理组为 4.52 cm, 比对照降低 47.7% ($P < 0.05$). 而 Ni²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺ 处理组的根长与对照差异不显著

($P > 0.05$).

重金属处理后根端形态也发生明显变化 特别是用 5×10^{-3} — 1×10^{-2} mol/L 的 Hg²⁺、Cd²⁺ 和 Pb²⁺ 处理 24 h 后, 部分根尖出现扭曲, 且有不同程度的膨大变粗 处理至 48 h, 这些根尖变黄, 严重的呈棕黄色 而其余浓度的重金属对根端的毒害作用相对较小, 根的形态在整个处理期间基本正常

表 1 不同浓度重金属处理 72 h 对大麦根长(cm)的影响

Table 1 Effects of different concentrations of heavy metals on length of root (cm) after 72 h treatment

重金属	重金属浓度, mol/L						
	CK	5×10^{-5}	1×10^{-4}	5×10^{-4}	1×10^{-3}	5×10^{-3}	1×10^{-2}
Hg ²⁺	8.65	2.81 ^b	1.86 ^b	1.65 ^b	1.23 ^b	0.57 ^b	0.53 ^b
Cd ²⁺	8.65	3.64 ^b	2.49 ^b	2.18 ^b	1.44 ^b	0.76 ^b	0.65 ^b
Pb ²⁺	8.65	4.52 ^a	3.36 ^b	2.52 ^b	1.68 ^b	1.47 ^b	0.87 ^b
Ni ²⁺	8.65	6.24	5.82	3.92 ^b	2.49 ^b	1.58 ^b	0.98 ^b
Cu ²⁺	8.65	6.65	6.24	4.15 ^a	2.93 ^b	1.78 ^b	1.65 ^b
Zn ²⁺	8.65	7.88	6.87	5.46 ^a	3.57 ^b	2.626	1.96 ^b

t 检验 a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$

2.2 重金属对根尖细胞分裂和染色体的影响

实验结果表明, 大麦根尖经重金属离子处理后, 细胞有丝分裂指数均不同程度下降。由图 2 可见, Hg²⁺、Cd²⁺ 和 Pb²⁺ 在所有浓度范围内一直表现出对细胞分裂的抑制。1 × 10⁻³ mol/L 以下浓度的 Ni²⁺ 和 Zn²⁺ 处理至 48 h 时分裂指数略有上升, 但随着处理时间延长又缓慢下降。可以看出, Zn²⁺ 对细胞分裂的抑制作用最小。值得注意的是, 高浓度(1 × 10⁻² mol/L)的 Hg²⁺、Pb²⁺ 和 Cd²⁺ 处理 24 h 后, 分裂指数迅速下降, 至 48 h 时分裂指数降为 0, 这与前述的这几种重金属对根生长的影响有很好的一致性。同时也说明, 重金属对根生长的抑制主要是由于抑制了细胞的有丝分裂。

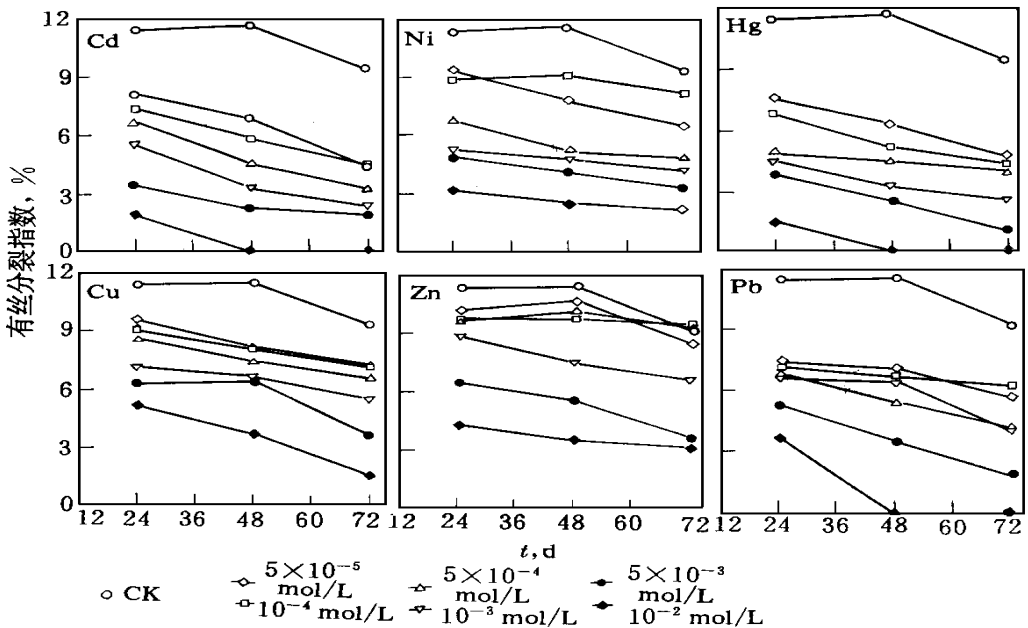


图 2 不同浓度重金属处理不同时间根尖细胞的有丝分裂指数

Fig 2 Mitotic index of root tip cells of *H ordeum vulgare* treated with different concentrations of heavy metals for different duration

重金属处理后的细胞中, 有丝分裂出现异常, 染色体畸变率与对照相比显著提高。图 3 表明, 在 5×10^{-5} — 1×10^{-3} mol/L 浓度范围内, 有丝分裂总畸变率随处理时间延长而上升,

呈明显的正相关,但 $1 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 的 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 处理后却检测不出染色体畸变类型,这是由于细胞分裂被完全抑制,说明过高的浓度不利于有丝分裂异常的检出。从染色体畸变类型来看, Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 处理后,细胞中染色体断裂(图 4: g)、粘连(图 4: d, f)的数量明显增多。 Cd^{2+} 处理的细胞中观察到较多的微核(图 4: h)。 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 处理后 c-有丝分裂(图 4: a, b)和染色体桥(图 4: c, d)比较普遍,而 Ni^{2+} 可诱发较高比例的多倍化细胞。总的来看, Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 的细胞学毒害作用最大,其次是 Pb^{2+} 和 Ni^{2+} , Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 最小。

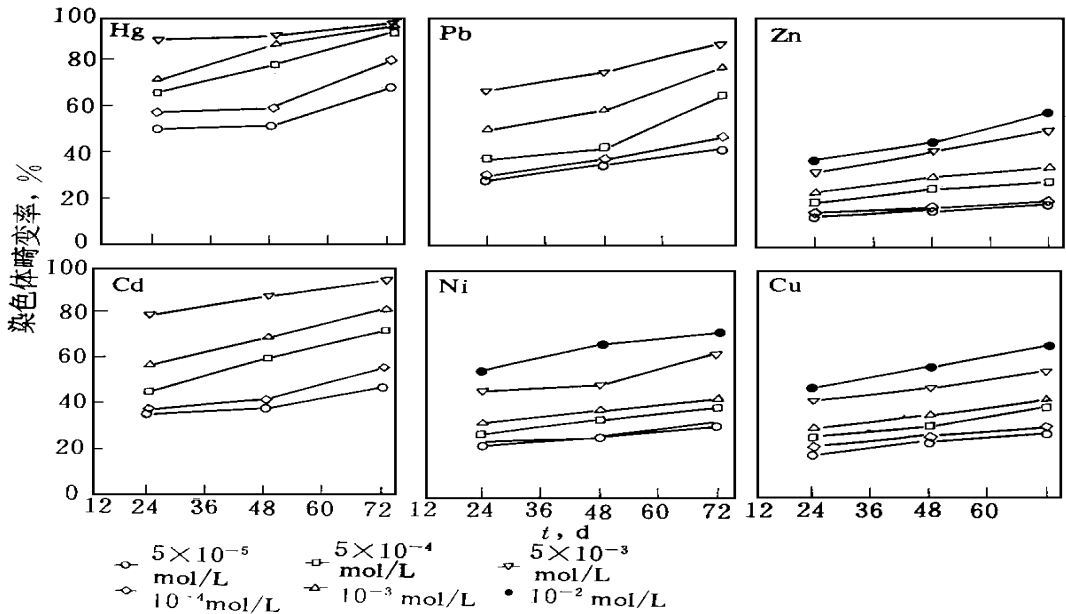


图 3 不同浓度重金属处理不同时间根尖细胞染色体畸变率

Fig 3 Frequency of chromosomal aberrations in root tip cells of *H. ordeum vulgare* treated with different concentrations of heavy metals for different durations

2.3 重金属对核仁的影响

正常情况下,二倍体大麦细胞核中含有 1—4 个核仁(图 4: i)。在重金属作用下,核仁的结构和数量也发生很大变化。银染结果显示,较高浓度(5×10^{-3} — $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$)的 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 处理 24 h 后和 Ni^{2+} 处理 48 h 后,根尖分生组织细胞内出现多核仁现象,核仁数目从 5、6、7 个至十几个不等(图 4: k)。但新增加的核仁体积较小,一般为主核仁的 $1/3$ — $1/4$ 。当处理时间超过 48 h,许多银染核仁颗粒从细胞核进入细胞质(图 4: j)并分布在整个细胞中(图 4: l)。而在同样条件下, Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 处理的细胞中未观察到此现象。这表明重金属对核仁结构的损伤也是有差异的。

3 讨论

本文从宏观和微观二方面比较研究了 6 种重金属对大麦幼苗的毒害效应。结果表明,不同浓度的重金属均能抑制种子萌发和根的生长,外观表现为生长的延缓或停滞。重金属浓度越大,作用时间越长,抑制效应越强。重金属处理后,阻碍了细胞向分裂状态转化,使参与分裂的细胞数目减少,导致有丝分裂指数降低。本实验还证明,重金属对大麦具有较强的诱变

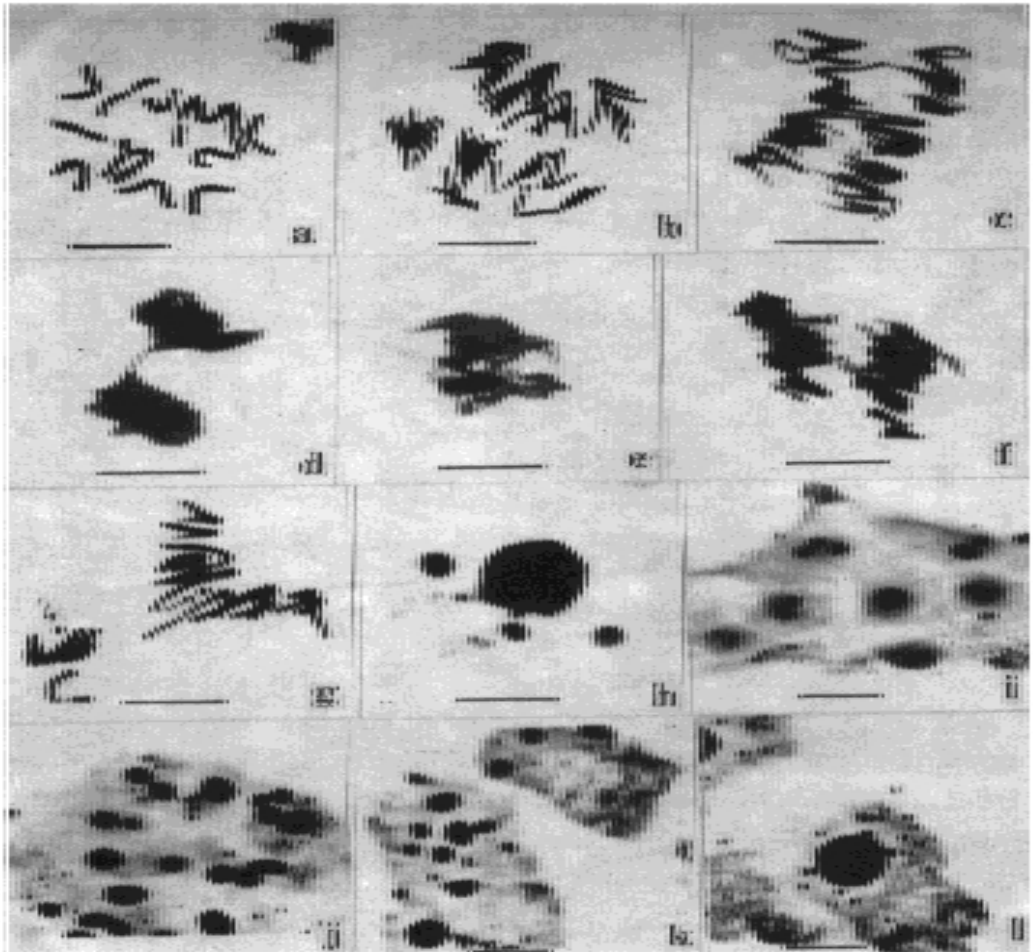


图 4 重金属对大麦的细胞学毒害效应

a c-有丝分裂中期(5×10^{-3} mol/L Ni^{2+} , 48 h). b c-有丝分裂后期(1×10^{-3} mol/L Zn^{2+} , 48 h). c 染色体桥(5×10^{-4} mol/L Cu^{2+} , 24 h). d 染色体桥粘连(5×10^{-3} mol/L Cd^{2+} , 48 h). g 染色体断裂(5×10^{-3} mol/L Hg^{2+} , 48 h). h 微核(5×10^{-3} mol/L Cd^{2+} , 72 h). i 对照细胞 e, f 中、后期染色体粘连(1×10^{-3} — 5×10^{-3} mol/L Pb^{2+} , 48 h) j 核仁被分解成许多核仁颗粒(5×10^{-4} mol/L Cd^{2+} , 24 h). k, l 许多银染核仁颗粒分布在细胞质中(1×10^{-3} — 5×10^{-3} mol/L Pb^{2+} , 48—72 h) (标尺= 5 μm)

a c-metaphased (5×10^{-3} mol/L Ni^{2+} , 48 h). b c-anaphase (1×10^{-3} mol/L Zn^{2+} , 48 h). c Chromosome bridges (5×10^{-4} mol/L Cu^{2+} , 24 h). d Chromosome bridges exhibiting stickiness (5×10^{-3} mol/L Cd^{2+} , 48 h). e-f Chromosome stickiness at metaphase and anaphase (1×10^{-3} — 5×10^{-3} mol/L Pb^{2+} , 48 h). g Chromosome breaks (5×10^{-3} mol/L Hg^{2+} , 48 h). h Micronuclei (5×10^{-3} mol/L Cd^{2+} , 72 h). i Control cells j The nucleolus was disintegrated and forming nucleolar particles (5×10^{-4} mol/L Cd^{2+} , 24 h). k-l. Some of same silver-stained nucleolus particulates scattered in the cytoplasm (1×10^{-3} — 5×10^{-3} mol/L Pb^{2+} , 48—72 h). Scale = 5 μm .

Fig 4 Cyto toxic effects of some heavy metals in *Hordeum vulgare*

作用,其中以 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 对染色体和核仁的毒害最为严重。这同前人在其它植物中所得到的结果相同^[7-9]。说明在作物类中,利用大麦作材料检测重金属毒害效应是适宜的^[10]。通过对各项指标的分析,可以得出 6 种重金属的毒性大小顺序为: $\text{Hg}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ 。

已有的研究表明,重金属进入植物体后主要积累在根部^[7],产生遗传毒害的时间主要是在细胞分裂间期的 DNA 和染色体复制过程中,其作用可能是直接的,而大部分是间接的^[11, 12]。业已证明, Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 是生物的非必需元素,也是毒性较强的诱变剂。一般认为 Hg^{2+} 易与酶活性中心的 SH 基结合,抑制酶的催化活性,干扰细胞的正常代谢。 Hg^{2+} 还能改变生物大分子如核酸和蛋白质的构象,在分子水平上造成 DNA 的损伤,引起染色体畸变^[13]。而 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 则能以一种可交换的形式取代或置换 Ca^{2+} ,并与细胞膜表面的 SH 基结合,阻止 Ca^{2+} 的跨膜内流,使钙调素 (CaM) 和 Ca-ATP 酶不能被激活^[14]。进入细胞的 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 还能与带负电的核酸结合,降低 RNA 和 DNA 的活性,引起核酸裂解并影响到细胞有丝分裂过程^[15, 16]。在本实验中,这 3 种重金属处理的细胞中出现较高比例的染色体断裂、微核等,与上述结论是一致的。

Ni^{2+} 是动物和某些植物的必需元素,也是一种重要的环境污染物,对农作物生长具有危害作用^[17]。国外的研究表明, Ni^{2+} 污染可降低植物细胞分裂指数,增加染色体畸变率^[18]。有证据显示, Ni^{2+} 易被多数植物所吸收,可与其它阳离子 (Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等) 产生竞争作用,降低或抑制某些酶 (ATP 酶、苹果酸脱氢酶等) 的活性,通过干扰核酸和蛋白质的合成而发挥其毒性作用^[19, 20]。在本实验条件下,较高浓度的 Ni^{2+} 可明显抑制细胞分裂,对染色体结构造成损伤,尤其是提高了多倍体细胞的比率,表明 Ni^{2+} 对纺锤体的破坏尤为严重。 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 是动、植物生长的必需元素,主要结合于许多金属酶和蛋白质之中,参与生物体的新陈代谢。但由于重金属在植物体内具有累积作用,较长时间的处理仍会产生细胞学毒害,诱发诸如 c—有丝分裂、染色体桥等畸变类型。目前的研究认为,过量的 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 对植物体产生毒性的生物学途径可能有二个方面。一是大量的重金属离子进入植物体内干扰了离子间原有的平衡系统,造成正常离子的吸收、运输、渗透和调节等方面的障碍,从而使代谢过程紊乱^[4]。二是较多量的单一重金属元素进入体内后,与某些酶蛋白的非活性基团结合使其变性,或取代某些酶和蛋白质行使其功能时所必需的特定元素^[21]。

银染结果表明,除 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 外,其余 4 种重金属 (Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ni^{2+}) 对核仁结构均有损伤,其损伤程度与重金属毒性大小有关。作者认为,细胞质中所有的银染颗粒均来自核仁结构的解体,因为它们表现出与核仁相同的银染反应。这种现象也必定与细胞核的损害有关^[22]。核仁结构受到破坏势必影响其功能的正常发挥,并对细胞的生理生化过程产生严重影响。这可能是重金属对植物产生细胞遗传学毒害效应的另一重要原因。因此,作者建议,应将 Ag-NOR 技术作为检测重金属污染的常规方法加以推广,而核仁结构损伤亦可成为评价重金属毒害的一项细胞学指标加以应用。

参 考 文 献

- 1 Foy C D Chaney R L, White M C. The physiology of metal toxicity in plants. *Ann Rev Plant Physiol*, 1978, 29: 511—566
- 2 Scheinberg H. Metals and their compounds in the environment. VGH, Germany, 1991: 893—907
- 3 高圣义,王焕校,吴玉树. 锌污染对蚕豆部分生理生化指标的影响. *中国环境科学*, 1992, 12(4): 281—284

- 4 杨志敏 锌污染对小麦萌发生长和某些生理生化特性的影响 农业环境保护, 1994, 13(3): 121—123
- 5 祁忠占, 彭永康, 宋玖雪等 汞对蔬菜幼苗生长及氧化酶同工酶的影响 环境科学学报, 1991, 11(3): 370—374
- 6 李懋学, 张赞平, 袁甲等 一种改进的植物染色体Ag-NOR染色方法及其应用 植物学通报, 1990, 7(1): 56—60
- 7 Chakravarty B, Srivastava S Toxicity of some heavy metals in vivo and in vitro in *Helianthus annuus* Mutation Res, 1992, 283(3): 287—294
- 8 Lerd D. The effects of lead on *Allium cepa* L. Mutation Res, 1992, 281(1): 89—92
- 9 段昌群, 王焕校 重金属对蚕豆的细胞遗传学毒理作用和对蚕豆根尖微核技术的探讨 植物学报, 1995, 37(1): 14—24
- 10 Zhang Y X, Yang X L. The toxic effects of cadmium on cell division and chromosomal morphology of *Hordeum vulgare* Mutation Res, 1994, 312(2): 121—126
- 11 Shahin S A, El-Amoodi K H. Induction of numerical chromosome aberrations during DNA synthesis using the fungicides nimbrod and rubgan-4 in root tips of *Vicia faba* L. Mutation Res, 1991, 261(2): 169—176
- 12 Frankel D G, Charlien M. Effects of lead acetate on DNA and RNA synthesis by intact HeLa cells isolated nuclei and purified polymerases Biochemical Pharmacol, 1987, 36: 265—268
- 13 张毓琪, 陈叙龙 环境生物毒理学 天津: 天津大学出版社, 1993: 60—74
- 14 文充镒 钙与钙调素 北京: 化学工业出版社, 1989: 63—164
- 15 Degraeve N. Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium. Mutation Res, 1981, 86(2): 115—135
- 16 Kazantzis G Mutagenic and carcinogenic effects of cadmium. Toxicol Environ Chem, 1984, 8(2): 267—278
- 17 沈明珠, 曹洪法, 瞿爱权等 农业环境的污染和保护 北京: 中国青年出版社, 1984: 82—121
- 18 Leonard A, Gerber G B, Jacquet P. Toxicity mutagenicity and teratogenicity of nickel Mutation Res, 1981, 87(1): 1—5
- 19 王鹏新 土壤和植物中的镍及其相互关系 农业环境保护, 1993, 12(5): 213—216
- 20 王 主编 生命科学中的微量元素 北京: 中国计量出版社, 1992
- 21 Chao S H et al Li J. Study on the zinc toxicification in the wheat seeds Mol Pharmacol, 1984, 26: 75
- 22 Zhang Y X. Effects of aluminum chloride on the nucleus and nucleolus in root tip cells of *Hordeum vulgare* Mutation Res, 1995, 335(2): 137—142

1995-11-27 收到

TOXICITY OF HEAVY METALS TO HORDEUM VULGARE

Zhang Yixian

(Department of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006)

ABSTRACT The toxic effects of six heavy metals (Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) at different concentrations on *Hordeum vulgare* seedlings were studied. The results indicated that the percentage of seed germination rate of root growth and mitotic index decreased progressively with the increasing of concentrations of heavy metals and treatment durations. After 24 h treatment with $1 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ Hg^{2+} , Cd^{2+} , and Pb^{2+} , cell division was completely inhibited by Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} . The total frequency of chromosomal aberrations induced by Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} was higher than that of Ni^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} . After the treatment with Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} at concentrations of 5×10^{-3} — $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ for 24 h and Ni^{2+} at same concentration for 48 h, the nucleolus was disintegrated and forming a large amount of nucleolar particles which go into the cytoplasm from the cell nucleus. But after the treatment with Cu^{2+} and Zn^{2+} , the nucleus was not affected. The order of six heavy metals on cytogenetical toxic effects is $\text{Hg}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$. The possible mechanism of poisoning of heavy metals on plant cells was also discussed.

Keywords heavy metals, *hordeum vulgare*, mitotic index, chromosomal aberrations, nucleolus, silver staining